

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 802 645

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

99 15884

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 33/53, C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 16.12.99.

③③ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : MEILLAT ROLAND — FR.

⑦② Inventeur(s) : VEGA MANUEL.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.06.01 Bulletin 01/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ METHODE D'EVALUATION DE LA PERFORMANCE D'UN ENSEMBLE D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES
CELLULES CIBLES VIVANTES ET SES APPLICATIONS.

⑤⑦ Méthode d'évaluation de la performance d'un ensem-
ble d'agents biologiques, tel qu'une banque de vecteurs de
transfert de gènes dans des cellules cibles vivantes (système
biologique complexe).

FR 2 802 645 - A1



L'invention est relative à une méthode d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques, tel qu'une banque de vecteurs de transfert de gènes dans des cellules cibles vivantes (système biologique complexe).

Les progrès relatifs aux transferts de gènes en thérapie génique
5 dépendent de la capacité à développer des vecteurs permettant l'expression d'une substance au niveau de la cellule cible, ladite substance ayant effectivement un effet thérapeutique au niveau de ladite cible. Il est donc important de pouvoir disposer de vecteurs de qualité clinique, utilisables dans des essais de phase I.

Pour l'obtention d'une information quantitative concernant les
10 performances potentielles d'un vecteur de transfert de gène, les paramètres d'évaluation proposés dans la littérature sont :

. le titre en particules physiques (*pp*) (Mittereder et al., J. Virol., 1996, 70, 11, 7498-7509 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823 ; Kechli et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 4, 587-590 ; Nelson et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9,
15 16, 2401-2405), qui représente le contenu total en particules de vecteur ; habituellement ce titre est évalué soit à partir du contenu en acides nucléiques des vecteurs (hybridation des acides nucléiques ou DO_{260} respectivement pour AAV et AdV), soit à partir du contenu en protéines virales (activité RT et contenu en p24, par exemple pour MLV et HIV, respectivement) ; la mesure physique des particules virales ou des
20 génomes présente l'inconvénient de pouvoir être confondue avec la présence de particules défectives (*defective-interfering particles* ou *DI*) et

. le titre en particules infectieuses (*ip* : unités infectieuses, unités de transduction) (Mittereder et al., précité ; Weitzman et al., J. Virol., 1996, 70, 3, 1845-1854 ; Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 5, 695-706) est évalué par l'étude des
25 changements observés dans les cellules infectées (réplication virale, intégration du provirus, lyse cellulaire, expression du transgène), par des méthodes essentiellement basées sur les dilutions en série, suivies soit par une extrapolation linéaire, soit par une approximation asymptotique ; ainsi *ip* mesure le nombre de particules actives dans le processus dont l'effet est mesuré : *ip* ne correspond donc pas à toutes les particules
30 potentiellement actives ; *ip* constitue une partie des particules physiques (*pp*), l'autre partie desdites particules physiques étant constituée par des particules inactives (*nip* ou *non-infectious particles*),

. la détection des plaques, dans le cas de virus lytiques ; cette méthode est quantitative mais difficile à mettre en œuvre et ne peut pas s'appliquer aux virus non-cytopathiques et

. la variation des rapports particules/infectivité.

5 Par exemple, dans l'article au nom d'E.M. Atkinson et al. (NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) et dans la Demande Internationale PCT WO 99/11764, pour résoudre le problème de la détermination du titre et la comparaison de différents virus recombinants utilisés en thérapie génique, il est proposé une nouvelle méthode, considérée comme plus fiable que celles antérieurement utilisées et qui met en œuvre
10 essentiellement une étape d'amplification du matériel génétique viral dans une lignée cellulaire hôte, des préparations de vecteur standard de titre connu obtenues par dilutions en série et un contrôle interne de titre connu. De manière plus précise, la méthode comprend dans différents puits d'une plaque de microtitration, l'infection de cellules à l'aide d'une préparation virale, la réplication du génome viral dans ladite
15 cellule hôte, la lyse chimique de ladite cellule, une hybridation de l'acide nucléique puis la détermination de la quantité relative d'acide nucléique viral répliqué dans chaque puits.

Dans l'article au nom d'A.R. DAVIS et al. (Gene Therapy, 1998, 5, 1148-1152), il est considéré qu'une utilisation optimale des adénovirus recombinants
20 en thérapie génique passe par le développement d'une technique adaptée à la séparation rapide de nouveaux recombinants qui ne sont pas contaminés par le virus sauvage. Pour ce faire, les Auteurs de cet article proposent de créer des adénovirus recombinants en cotransfectant des cellules 293 avec l'ADN viral dérivé à partir de la région 3' du génome d'un recombinant qui ne comprend pas la région E1 mais qui
25 exprime la protéine fluorescente (GFP ou *green fluorescent protein*) et un plasmide portant la région 5' du génome ; la cotransfection peut ainsi être visualisée par microscopie de fluorescence.

Les méthodes de l'art antérieur font appel exclusivement à la mesure du titre en particules physiques (*pp*) et/ou à la mesure du titre en particules infectieuses (*ip*) pour évaluer un vecteur de transfert de gène. Les préparations de vecteur
30 avec un titre élevé en particules infectieuses et un rapport particules physiques/particules infectieuses faible sont considérées comme étant de haute qualité,

ces deux paramètres étant considérés comme fournissant une information quantitative concernant la performance d'un vecteur de transfert de gène.

Toutefois, les procédures actuelles utilisées pour évaluer pp ainsi que ip varient selon le type de vecteur, sont peu reproductibles et imprécises ; en outre, ces paramètres ne sont pas suffisamment informatifs pour permettre de définir de manière précise les caractéristiques d'un vecteur et donc d'évaluer ses performances.

La présente invention s'est en conséquence donnée pour but, de fournir un procédé standardisé qui soit apte à évaluer l'interaction entre un vecteur de thérapie génique et plus généralement de n'importe quel agent biologique, avec un système biologique complexe (cellules cibles vivantes).

La présente invention a pour objet un procédé d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques complexes dans des cellules cibles vivantes, avec lesquelles lesdits agents biologiques interagissent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- (a) la préparation, pour chaque agent biologique dudit ensemble, d'une gamme d'échantillons, obtenue par dilutions en série dudit agent biologique à une concentration R_1 ,
- (b) l'incubation de chaque échantillon de ladite gamme de dilutions obtenue en 1. avec lesdites cellules cibles à une concentration constante R_2 ,
- (c) la détermination du produit P de la réaction $R_1 + R_2$, à un instant t , dans chacun desdits échantillons,
- (d) l'établissement d'une courbe théorique H à partir desdits points expérimentaux R_1 et P , pour chaque agent biologique par approximation itérative de paramètres qui reflètent la réaction $R_1 + R_2 \rightarrow P$, audit instant t , conformément à l'équation suivante :

$$P = P_{\max} (\pi R_1)^r / (\kappa + (\pi R_1)^r) \quad r=1, \dots, n \quad (2),$$

dans laquelle :

R_1 représente la concentration en agent biologique dans un échantillon de la gamme,

P représente le produit de la réaction $R_1 + R_2$ à un instant t ,

P_{\max} représente la capacité maximale de la réaction,

κ représente la résistance du système biologique à une concentration constante R2 à répondre audit agent biologique (constance de résistance de R2),

r représente un coefficient qui dépend de R1 et qui correspond au coefficient de Hill, et

5 π représente la puissance intrinsèque de l'agent biologique R1 à induire une réponse dans le système biologique (production de P à l'instant t), et

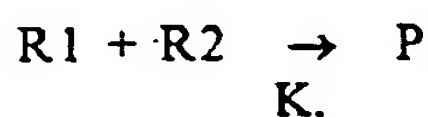
(e) le tri des valeurs de κ et de π obtenues en (d), pour chaque agent biologique et la sélection de l'agent biologique le plus adapté à l'application recherchée.

10 Le procédé selon l'invention consiste à analyser pour chaque gamme d'agent biologique à tester, sur la base de l'équation de Hill, la réponse du système biologique (production d'un produit P à un instant t).

L'équation de Hill est une formalisation générale qui décrit l'interaction entre différentes molécules. Elle exprime la quantité de produit formé
15 comme une fonction de la concentration des réactifs et de la constante d'affinité du système.

Originellement développée pour l'étude de la dissociation entre l'hémoglobine et l'oxygène, l'équation de Hill englobe l'analyse de la cinétique enzymatique par l'équation de Michaelis-Menten, l'analyse de la liaison ligand-
20 récepteur et l'analyse des systèmes allostériques.

En effet, conformément à Hill, pour une réaction simple :



25 dans laquelle l'affinité K entre R1 et R2 change en fonction de leurs concentrations ; l'équation de Hill décrit l'accumulation du produit P comme une fonction de la concentration de l'un des réactifs (R1) et des propriétés intrinsèques (K) du système.

$$30 \quad P = \sum_{r=1}^{r=n} P_{\max} \cdot R1^r / (K + R1)^r \quad (R2 \text{ constante}) \quad (1)$$

dans laquelle R1, P, P_{\max} et K représentent respectivement la concentration du réactif R1, la concentration du produit P, la capacité maximale de la réaction et la constante d'affinité entre R1 et R2.

Le coefficient de Hill r est une fonction de R_1 . r est égal à 1 lorsque des sites de liaison interactifs indépendants sont impliqués entre R_1 et R_2 , comme dans le cas décrit par Michaelis-Menten. r varie de 1 à n pour des systèmes dans les lesquels les sites impliqués dans l'interaction entre R_1 et R_2 ne sont pas indépendants
5 les uns des autres. L'affinité pour R_1 au niveau de n'importe quel site de liaison de R_2 varie comme une fonction soit du degré d'occupation des autres sites de R_2 , soit de la concentration de R_1 lui-même ou soit de la concentration d'autres régulateurs (positifs ou négatifs).

Ces analyses basées sur l'équation de Hill se sont toujours limitées à
10 des protéines individuelles ou à des systèmes simples mis en œuvre dans des conditions expérimentales définies de manière très précise.

Il n'était pas pensable, jusqu'à présent que l'équation de Hill puisse s'appliquer à l'interaction entre des systèmes complexes telles que les cellules vivantes et des agents biologiques complexes tels que les virus, les vecteurs de transfert de gènes, les vaccins, les protéines recombinantes ou les anticorps, par exemple.
15

De manière surprenante, l'Inventeur a maintenant trouvé que l'analyse de systèmes complexes tels que l'infection d'une cellule par un virus ou un vecteur de thérapie génique, était possible par sélection de paramètres directement dérivés de l'équation de Hill.

20 *Premières définitions*

- R_1 correspond à la concentration en agent biologique ; il peut signifier, dans la présente invention, selon le contexte, l'ensemble des concentrations obtenues par dilution de la préparation d'agent biologique, utilisées pour déterminer le produit P ou l'agent biologique lui-même ;

25 - on entend par agent biologique ; un vecteur de transfert de gènes, un virus, un anticorps, un vaccin ou une protéine recombinante ;

- R_2 correspond à la concentration des cellules cibles vivantes, il peut signifier , dans la présente invention, selon le contexte, la concentration des cellules cibles vivante (constante) utilisée pour déterminer le produit P ou les cellules
30 cibles vivantes elles-mêmes ;

- on entend par cellules cibles vivantes, des cellules cibles *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*, avant leur modification par un agent biologique ;

- P (*output*) représente la réponse des cellules cibles R2 à chaque dilution d'agent biologique (*input*) à une concentration R1 ; le produit P peut être déterminé soit directement, soit indirectement par la mesure de paramètres biologiques reflétant la réponse du système biologique (cellules cibles) audit agent biologique (ou réaction R1+R2 ou processus biologique) ; il s'agit notamment de la mesure d'une activité enzymatique, de l'expression d'un transgène, de la productivité d'un virus, de la cytotoxicité, de la tumorigenèse, de l'immunogénicité etc..... Dans ce cas, le test biologique mis en œuvre pour déterminer P est soit un test *in vitro*, soit un test *in vivo* ; il permet de déterminer des paramètres biologiques représentatifs de la réponse du système biologique à l'agent biologique étudié ;

- les techniques utilisées pour déterminer, estimer, analyser ou calculer les valeurs de P à un instant t sont, de manière non limitative, des mesures de radioactivité, de fluorescence, de luminescence, d'absorbance ou le dénombrement de cellules ;

- le paramètre π : π mesure la puissance intrinsèque de l'agent biologique pour produire P dans les cellules cibles vivantes considérées ; π s'oppose à κ (constante de résistance) qui constitue le facteur d'opposition desdites cellules à la production de P ; par exemple, dans le cas où l'agent biologique est représenté par des particules virales infectieuses (R1), l'on peut considérer que pour chaque particule virale infectieuse ajoutée, l'activité du virus est donnée par l'équation $\pi R1$; pour obtenir une réponse des cellules cibles vivantes (production de P), la puissance intrinsèque π doit être supérieure à κ dans la cellule. π constitue une caractéristique spécifique de l'agent biologique étudié ; dans ce contexte, des variants d'un agent biologique étudié ne présenteront pas la même valeur de π dans un processus réactionnel donné. On peut considérer que π constitue un paramètre reflétant l'activité chimique par opposition à la concentration pour des composés chimiques simples. π constitue un facteur de correction qui affecte la concentration R1 de l'agent biologique pour indiquer sa force ou activité réelle dans un processus réactionnel donné ; les variations de π affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe vers la droite ou vers la gauche selon que la valeur de π décroît ou croît ; la pente de la courbe obtenue à l'étape (d) augmente, lorsque π augmente ; les courbes obtenues à l'étape (d), qui ne diffèrent entre elles

qu'en ce qui concerne le paramètre π , ne sont pas parallèles entre elles ; π est un paramètre clé pour la caractérisation de l'agent biologique et la détermination de sa performance pour accomplir la réaction (processus biologique) étudiée : π trouve une application directe et pratique dans l'optimisation et la mise au point de l'agent biologique utilisé, dans la mesure où ce paramètre permet de comparer la puissance relative de variants dudit agent ; toutefois, ce paramètre ne permet pas seul d'évaluer l'ensemble du système ;

- le paramètre κ (constante de résistance) : κ mesure la résistance interne des cellules cibles vivantes au processus biologique induit par l'agent biologique pour l'obtention de P ; κ est une caractéristique spécifique du processus biologique (réaction entre R1 et R2) particulier et des cellules cibles vivantes (type cellulaire) testées : le même processus biologique pour des lignées ou des types cellulaires différents conduira à l'obtention de paramètres κ différents ; de plus, les facteurs qui ont une influence sur la performance d'une cellule dans la réalisation dudit processus biologique, tels que les agents contaminants ou les agents toxiques, modifient la valeur de κ pour ladite cellule ; on peut considérer que κ est analogue aux constantes de dissociation ou d'affinité pour des composés chimiques ou des réactions biologiques simples ; les variations de κ affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe de la droite vers la gauche, selon que κ augmente ou diminue ; les courbes obtenues à l'étape (d), qui ne diffèrent entre elles qu'en ce qui concerne le paramètre κ , sont parallèles entre elles ; κ est un paramètre clé pour l'estimation des performances du test biologique sélectionné pour évaluer la réaction globale (réaction R1+R2) ; κ trouve une application directe et pratique dans le développement et la validation du test sélectionné pour évaluer la réaction dans laquelle intervient l'agent biologique et dans l'évaluation de la susceptibilité ou la sensibilité de différents types cellulaires à participer à ladite réaction.

De manière surprenante, conformément au procédé selon l'invention, différents agents biologiques complexes et/ou différentes cellules cibles vivantes peuvent être comparés et classés sur la base de leur performance évaluée par au moins les deux paramètres ci-dessus mentionnés, désignés par l'expression « paramètres de Hill ».

Ainsi une analyse précise et une comparaison de la réponse biologique des cellules cibles vivantes tant *in vitro* qu'*in vivo* à des agents biologiques complexes devient effectivement possible.

Également conformément à l'invention un certain nombre de paramètres, dérivés de l'équation de Hill, peuvent être enregistrés et utilisés pour quantifier des caractéristiques pertinentes d'un système complexe : agent biologique, cellules cibles et processus ou réaction, résultant de leur interaction.

Par exemple, dans le cas où le système complexe est représenté par l'infection d'une cellule par un virus, on peut observer un grand nombre d'interactions (protéine/protéine, protéine/acide nucléique, protéine/petite molécule), qui sont susceptibles d'être, conformément à l'invention, décrites par le procédé mettant en œuvre l'équation de Hill. La réaction globale, formalisée par les réactifs entrants (*input*), à savoir les virus et les cellules et les produits de la réaction (*output*) [réponse cellulaire à l'infection] peut être analysée en utilisant l'équation de Hill, et ce, quel que soit le nombre d'étapes intermédiaires.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

Des réactions complexes, telles que celles impliquant l'interaction entre des virus recombinants (R1) et des cellules vivantes (R2) et qui induisent une réponse biologique, peuvent être analysées et les réactifs (R1 et R2) caractérisés par le procédé selon l'invention mettant en œuvre l'équation de Hill (paramètres π et κ) et éventuellement au moins l'un des paramètres dérivés, tels que définis ci-après.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, à l'étape (c), la détermination de P est réalisée soit de manière directe, par exemple par dosage de P, soit de manière indirecte, par exemple, à l'aide d'un test biologique convenablement sélectionné pour la mesure d'au moins un paramètre ou une variable reflétant la réponse des cellules cibles vivantes audit agent biologique, comme précisé ci-dessus.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il comprend, en outre, la mesure d'au moins l'un des paramètres dérivés suivants :

- l'efficacité globale ε de la réaction induite par l'agent biologique sur ledit système,

- le titre apparent τ de l'agent biologique,

- le titre absolu θ dudit agent biologique, et

5 - l'index d'hétérogénéité η de ladite réaction biologique.

Définitions de ces paramètres dérivés

- efficacité globale ε : ε mesure l'efficacité globale maximale de la réaction agent biologique (R1), caractérisé par un paramètre π donné et des cellules cibles vivantes (R2), caractérisées par un paramètre κ donné : ε est donc spécifique du couple agent biologique (π)/système biologique (κ) pour ce qui concerne la réaction étudiée ; des modifications des paramètres π et/ou κ entraînent des modifications du paramètre ε . ε est un paramètre clé pour la caractérisation de l'efficacité de la réaction globale mettant en œuvre R1 et R2 ; il est en particulier important et utile pour l'optimisation du *test* lorsque π et κ ont été sélectionnés et pour étudier de manière
10
15 séparée les modifications soit de π , soit de κ ;

- le titre apparent τ : dans l'équation de Hill (2), lorsque R1 augmente, r augmente de 1 à 2, 3, 4 et P approche sa valeur maximale P_{\max} . Dans l'autre direction, R1 ne peut diminuer que jusqu'à un point minimal ($R1_{\min}$), auquel correspondent les valeurs minimales de r et de P. La courbe sigmoïdale de Hill n'est pas symétrique : seul son bras droit est asymptotique (jusqu'à P_{\max}) ; sur son bras gauche, la courbe a une origine à $R1_{\min}$. D'un point de vue biologique, le fait qu'il n'existe pas de P pour $R1 < R1_{\min}$, signifie qu'il n'y a pas de produit de réaction lorsque la concentration en agent biologique est $< R1_{\min}$: le système ne répond pas à des valeurs de $R1 < R1_{\min}$. $R1_{\min}$ représente donc la quantité minimale de R1 qui
20
25 induit une réponse dans les cellules cibles vivantes concernées et est représenté par τ ; le titre, défini de cette manière, ne correspond ni à une valeur asymptotique, ni à une valeur approchée par extrapolation, mais un paramètre précis de l'équation de Hill et correspond à l'origine mathématique de la courbe théorique obtenue en (d). On peut donc considérer que τ mesure la dilution limite ou le titre apparent de l'agent biologique étudié ; la valeur de τ est déterminée par la limite de sensibilité du système et
30 par la méthode utilisée pour mesurer le produit P ; c'est la raison pour laquelle il est

dénommé titre apparent ; τ est spécifique de la quantité d'agent biologique testé et représente la concentration apparente de l'agent biologique ; il est exprimé en unités par volume (dilution maximale d'agent biologique qui induit la production de P). En d'autres termes, τ est représenté par le Rl maximal pour lequel le coefficient de Hill r atteint sa valeur minimale, ledit coefficient de Hill devenant constant pour une valeur égale à ou proche de 1. τ selon la présente invention, correspond au titre généralement utilisé pour les virus, les anticorps et les vecteurs ; toutefois, contrairement à ce qui est décrit dans l'art antérieur, ce paramètre seul ne permet pas d'évaluer un système biologique complexe. Les variations de τ affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe vers la droite ou vers la gauche, selon que la valeur de τ décroît ou croît, respectivement. τ constitue un paramètre clé qui mesure la concentration apparente du stock initial d'agent biologique, qui est nécessaire à l'usage que l'on souhaite en faire ;

- titre absolu θ : θ mesure le titre absolu en agent biologique ; la valeur de θ n'est ni déterminée, ni dépendante de la limite de sensibilité des cellules cibles testées ou de la méthode utilisée pour mesurer P ; c'est la raison pour laquelle θ est dénommé titre absolu ; θ est spécifique de la quantité initiale d'agent biologique testé ; il représente la concentration physique réelle en agent biologique et est exprimé en unités/volume (i. e. la dilution maximale d'agent biologique qui induit la production de P) ; θ est obtenu, conformément à l'équation (3) suivante :

$$\theta \pi = \tau / s \quad (3),$$

dans laquelle s représente la sensibilité de la méthode de détection.

En conséquence, pour des agents biologiques évalués en utilisant la même méthode de détection de P, l'expression suivante, représentée dans l'équation (4) suivante est valable :

$$\theta_1 \pi_1 / \tau_1 = \theta_2 \pi_2 / \tau_2 = \theta_n \pi_n / \tau_n = \text{constante} \quad (4).$$

En utilisant l'équation (4), le rapport entre deux titres absolus correspondant à deux préparations d'agents biologiques différents, peut être obtenu à partir des valeurs de π et de τ de ces deux préparations d'agents biologiques. Les variations de θ affectent l'équation (2) en déplaçant la courbe vers la droite ou vers la

gauche et/ou en changeant la pente de la courbe. θ est le paramètre qui mesure la concentration absolue initiale en agent biologique.

- l'index d'hétérogénéité η : η mesure l'hétérogénéité interne de la réaction. Les processus complexes, tels que ceux évalués dans la présente invention,
- 5 consistent en une succession d'événements dans un réseau multidimensionnel de réactions biologiques reliées entre elles et interrégulées. Ainsi, la constante de résistance κ pour une réaction particulière est un indicateur macroscopique de la résistance globale de la réaction biologique ($\kappa = \kappa_1 \times \kappa_2 \times \kappa_i \dots \kappa_n$). Si la contribution des constantes microscopiques de résistance ($\kappa_1, \kappa_2, \dots \kappa_i, \dots \kappa_n$) pour les paliers individuels impliqués
- 10 dans la réaction étaient homogènes, et qu'aucun seuil n'existait pour passer d'un palier à l'autre ; dans ce cas, on n'observerait aucune discontinuité dans l'évolution du coefficient de Hill par rapport à R1. Cependant, l'existence d'une hétérogénéité importante parmi les valeurs κ_i correspondant aux paliers individuels microscopiques pourrait conduire à une discontinuité macroscopique du système. Cette hétérogénéité
- 15 pourrait entraîner des modifications dans la variation du coefficient de Hill et en conséquence, le besoin d'un saut quantitatif des valeurs macroscopiques de κ afin que l'équation (2) s'ajuste aux données. La présence d'une hétérogénéité interne dans la réaction R1+R2 peut être détectée par l'apparition de paliers dans l'évolution du coefficient de Hill, correspondant à la courbe de Hill qui s'ajuste aux données expé-
- 20 mentales. η est donc défini comme l'index d'hétérogénéité et sa valeur correspond au nombre de paliers observés dans l'évolution du coefficient de Hill : un palier : $\eta = 1$; deux paliers : $\eta = 2$; trois paliers : $\eta = 3$; n paliers : $\eta = n$. η est un paramètre clé pour l'analyse détaillée de la réaction. Il est utile pour l'étude de chaque palier identifié. La présence de paliers se traduit par une discontinuité brusque de κ ; en
- 25 conséquence, chaque palier est déterminé par une constante de résistance macroscopique κ différente. Les systèmes dans lesquels $\eta = 2$ peuvent ainsi être décrits à l'aide d'une équation de Hill dans laquelle κ prend deux valeurs différentes : κ_1 et κ_2 , selon les valeurs de R1 considérées : une partie de la courbe est décrite par κ_1 et une autre partie de la courbe est décrite par κ_2 . Les courbes de Hill décrivant la réaction
- 30 globale, caractérisées par $\eta = 2$ sont des hybrides générées à partir de deux courbes de

Hill parallèles différant uniquement par le paramètre κ . La transition d'une courbe à l'autre peut modifier la pente de la courbe de Hill résultante.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la mesure du paramètre d'évaluation ε représentant l'efficacité spécifique d'un agent biologique apte à induire la production de P dans lesdites cellules cibles vivantes est réalisée :

- soit par mesure de la pente, de la courbe H théorique obtenue en (d), à son point d'inflexion,
- soit par calcul du maximum de la dérivée première $\delta P/\delta R_1$ et éventuellement de la dérivée seconde de la courbe théorique H obtenue en (d) ; en effet, l'efficacité de la réaction décrite dans l'équation (2) est donnée par l'augmentation de l'*output* P qui peut être obtenue en augmentant l'*input* R1. Ainsi, la dérivée première de P par rapport à R1, ou la pente de la courbe décrite dans l'équation (2) fournit l'efficacité globale de la réaction pour chaque *input* ou entrée R1.

L'efficacité globale maximale ou ε est donc bien exprimée directement soit par la pente au point d'inflexion de la courbe décrite dans l'équation (2), soit par le maximum de sa dérivée $\delta P/\delta R_1$. A la fois la pente de la courbe donnée par l'équation (2) et le maximum de $\delta P/\delta R_1$ augmentent lorsque ε augmente.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il comprend, en outre, la mesure des paramètres suivants : π/P_{\max} , κ/P_{\max} ou ε/P_{\max} . Ces valeurs corrigées sont indépendantes de la capacité maximale (P_{\max}), elles permettent donc de mieux comparer les différents paramètres, π , κ et ε dans le cas où P_{\max} serait différente selon les systèmes ou bien dans le cas où l'agent biologique affecterait P_{\max} .

Selon encore un autre mode de mise en œuvre dudit procédé, les valeurs des paramètres de Hill correspondant à chaque agent biologique sont comparées à celles obtenues avec un agent biologique de référence.

Également conformément à l'invention, pour valider l'analyse de la réaction R1+R2 par l'équation de Hill, le procédé peut comprendre en outre une étape de traitement des données expérimentales obtenues à l'étape (d) (Hill plot), conformément à l'équation suivante :

$\log |P/(1-P)|$ vs. $\log R1$.

Également conformément à l'invention, la sélection des agents biologiques, des vecteurs par exemple, présentant des valeurs minimales acceptables pour les paramètres sélectionnés : κ , r , ε , θ , τ , η , π/P_{\max} , κ/P_{\max} ou ε/P_{\max} peuvent
5 avantageusement être soumis à une analyse itérative pour obtenir la courbe H la mieux ajustée statistiquement aux valeurs expérimentales R1 et P.

Les agents biologiques, sélectionnés, conformément au procédé selon l'invention sont ensuite validés définitivement pour leurs propriétés biologiques.

De manière avantageuse, les paramètres κ , r , ε , θ , τ , η , π/P_{\max} ,
10 κ/P_{\max} ou ε/P_{\max} obtenus conformément au procédé selon l'invention sont utilisés pour :

- valider et optimiser les agents biologiques utilisables dans une application particulière ;
- développer et optimiser les tests de caractérisation des agents
15 biologiques sélectionnés.

En variante, ce sont les cellules cibles qui sont soumises à des dilutions en série, R1 étant constante ; les étapes (a) et (b) sont donc modifiées en conséquence et l'étape (d). comprend l'établissement d'une courbe théorique H la mieux ajustée aux valeurs expérimentales (P et R2) par itération, en attribuant des valeurs
20 aux différents paramètres de l'équation de Hill (P_{\max} , κ , π et r).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- 25 - la figure 1A représente les courbes théoriques de Hill (H) obtenues par itération à partir des valeurs expérimentales P et R1 ($f(\log dil)$) des deux échantillons 1 et 2 de rAAV. Les paramètres κ , π , τ et P_{\max} de ces deux échantillons ont été déterminés directement à partir de ces courbes théoriques ;
- la figure 1B représente la courbe $r = f(\log dil)$ qui permet de déter-
30 miner le paramètre d'homogénéité du système biologique (η) ;
- la figure 2 représente le plot de Hill ($\log |P/(1-P)| = f(R1)$) ;

- la figure 3; illustre l'obtention du paramètre ϵ ;
- la figure 4 représente les valeurs expérimentales obtenues (P et R1) et l'ensemble des valeurs théoriques calculées qui ont servi au tracé des différentes courbes présentées dans les figures 1 à 3 ;

5 - la figure 5 représente les valeurs des différents paramètres de Hill obtenues selon l'invention pour les deux échantillons de rAAV étudiés.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

10 **EXEMPLE : Évaluation de deux échantillons de vecteurs recombinants [virus associé à l'adénovirus recombinant (rAAV)] dans des cellules HeLa C37**

L'agent biologique étudié est un vecteur viral recombinant (rAAV). Deux stocks de rAAV (échantillon 1 et échantillon 2), obtenus selon les techniques classiques connues de l'homme du métier, décrites dans E.M. Atkinson et al. (NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) ont été évalués dans les cellules HeLa C37. Les cellules ont été ensemencées dans les puits d'une plaque de microtitration à une concentration R2 constante, puis infectées avec les dilutions en série des échantillons 1 et 2. Au temps $t=48h$ à $72h$, les cellules ont été récoltées puis le génome viral a été isolé et hybridé avec une sonde nucléotidique spécifique marquée, selon la technique du Dot Blot classiquement utilisée par l'homme du métier, décrite dans E.M. Atkinson et al. (NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823). Le signal (produit P) représentant la quantité d'ADN hybridée a été mesuré pour chaque dilution R1 des échantillons 1 et 2, à l'aide d'un phosphorimageur et les valeurs obtenues sont présentées dans la figure 4. Le test biologique mis en œuvre (hybridation) permet d'évaluer la réplication de l'agent biologique (rAAV) dans les cellules cibles HeLa C37.

Les étapes suivies, conformément au procédé selon l'invention pour analyser lesdits rAAV sont présentées ci-dessous. L'ensemble des valeurs des différents paramètres de Hill obtenues pour les échantillons 1 et 2 de rAAV est résumé dans la figure 5.

Etape 1 : Détermination de la courbe de Hill optimale (H) pour chaque préparation de vecteur (figure 1A)

La courbe de Hill optimale s'ajustant le mieux avec les valeurs expérimentales a été obtenue par itération en attribuant des valeurs aux différents paramètres de l'équation de Hill, à savoir: P_{\max} , κ , π , et r . Les meilleures courbes de Hill obtenues pour les échantillons 1 et 2 sont présentées sur la figure 1A, elles correspondent respectivement aux valeurs théoriques H1 et H2 des échantillons 1 et 2, (figure 4). Les valeurs de P sont exprimées en unités arbitraires (pixels) en fonction du log de la dilution du vecteur (R1).

10 Pour l'échantillon 1, on obtient :

$$P = 2,05 (0,125 R1)^r / (450 + (0,125 R1)^r)$$

Pour l'échantillon 2, on obtient :

$$P = 2,35 (0,172 R1)^r / (450 + (0,172 R1)^r)$$

* Avec $r=1,0, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75$

15 * Le système utilisé pour ce test (les cellules HeLa C37) est supposé montrer la même résistance vis à vis des deux échantillons ($\kappa=450$).

Etape 2 : Tracé du plot de Hill (figure 2A et 2B)

D'après les résultats expérimentaux (valeurs de P et de R1), le plot de Hill correspondant à $\log |P/(1-P)|$ en fonction de $\log R1$ a été tracé pour les deux échantillons [figures 2D (échantillon 1) et 2D' (échantillon 2)]. La régression linéaire obtenue montre que les données présentées dans la figure 1A répondent bien à l'équation de Hill.

Etape 3 : Détermination de la concentration limite (titre τ) des préparations de vecteur (figure 1A)

25 τ est déterminé par la valeur maximale de R1 pour laquelle le coefficient de Hill (sur la courbe optimale de Hill) est égal à 1. Les valeurs τ des échantillons 1 et 2 ont été déterminées à partir des courbes de la figure 1A, les valeurs obtenues sont de 5,89 pour les deux échantillons.

Etape 4 : Détermination de l'efficacité (ϵ) et de l'efficacité standardisée (ϵ/P_{\max}) (figure 3)

L'efficacité est la pente de la courbe de Hill (ou de toute courbe sigmoïdale traduisant les valeurs obtenues) à son point d'inflexion.

5 ϵ a été calculée comme suit :

La courbe H' ($H'=\delta H/\delta R_1$), dérivée de H a été tracée.

La valeur maximale atteinte par la courbe correspondant à ϵ a été déterminée pour les échantillons 1 et 2, les valeurs obtenues sont 0,808 et 0,906, respectivement (figure 3).

10 **Etape 5 : Détermination de l'homogénéité du système biologique (η), (figure 1B)**

La courbe r en fonction de $\log \text{dil}$ ($f(R_1)$) a été tracée et le nombre de paliers sur la pente de la courbe a été déterminé.

Le paramètre d'homogénéité η a été déterminé comme suit, en
15 fonction du nombre de paliers (un palier ; $\eta=1$, deux paliers ; $\eta=2$, x paliers ; $\eta=x$)

Pour le système biologique testé, on obtient $\eta=1$.

Etape 6 : Caractérisation complète du vecteur (figure 5)

L'ensemble des valeurs obtenues pour chacun des paramètres
suivants :

20 P_{\max} , κ , r , ϵ , τ , π , η , ϵ/P_{\max} , π/P_{\max} et κ/P_{\max} , permet de caractériser chaque préparation de vecteur.

Etape 7 : Classement des vecteurs en fonction de leur performance (figure 5)

Les vecteurs ont été classés en fonction des valeurs obtenues pour :

25 P_{\max} , κ , π , τ , π/P_{\max} et κ/P_{\max} .

L'analyse des valeurs des différents paramètres de Hill obtenues pour les deux échantillons de vecteur recombinant permet de tirer les conclusions suivantes :

Les deux échantillons montrent des titres apparents équivalents
30 ($\tau=5,89$) ; cependant les titres absolus sont différents $\theta_1/\theta_2=\pi_2/\pi_1=0,725$ et la

puissance de l'échantillon 2 ($\pi_1=0,172$) est supérieure à celle de l'échantillon 1 ($\pi_2=0,125$).

Cette valeur n'est pas compensée par la puissance corrigée π/P_{\max} puisque l'on retrouve une valeur pour l'échantillon 2 ($\pi/P_{\max}=0,07$) supérieure à celle
5 de l'échantillon 1 ($\pi/P_{\max}=0,06$).

En considérant que κ est constant, c'est-à-dire que les cellules HeLa C37 montrent la même résistance vis-à-vis des deux échantillons, l'échantillon 2 est légèrement plus efficace que l'échantillon 1 ($\epsilon_2=0,906 > \epsilon_1=0,808$) et sa capacité maximale $P_{\max}=2,35$ est supérieure à celle de l'échantillon 1 ($P_{\max}=2,05$).

10 Résultats :

Ces déterminations montrent que :

Les titres apparents de deux lots d'un même vecteur sont équivalents et correspondent à ce qui est généralement déterminé dans l'Art antérieur, alors que la détermination des paramètres de Hill et éventuellement des paramètres dérivés permet
15 de mettre en évidence des différences dans leur puissance corrigée et leur efficacité. La caractérisation de deux lots d'un même vecteur viral, à l'aide des paramètres pertinents de Hill et éventuellement de ses paramètres dérivés permet donc bien de valider et d'optimiser des agents biologiques (préparations de vecteurs viraux par exemple) utilisables dans une application particulière (thérapie génique *in vivo*).

20 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé d'évaluation de la performance d'un ensemble d'agents biologiques complexes dans des cellules cibles vivantes, avec lesquelles lesdits agents biologiques interagissent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- (a) la préparation, pour chaque agent biologique dudit ensemble, d'une gamme d'échantillons, obtenue par dilutions en série dudit agent biologique à une concentration R1,
- (b) l'incubation de chaque échantillon de ladite gamme de dilutions obtenue en 1. avec lesdites cellules cibles à une concentration constante R2,
- (c) la détermination du produit P de la réaction $R1 + R2$, à un instant t, dans chacun desdits échantillons,
- (d) l'établissement d'une courbe théorique H à partir desdits points expérimentaux R1 et P, pour chaque agent biologique par approximation itérative de paramètres qui reflètent la réaction $R1+R2 \rightarrow P$, audit instant t, conformément à l'équation suivante :

$$P = P_{\max} (\pi R1)^r / (\kappa + (\pi R1)^r) \quad r=1, \dots, n \quad (2),$$

dans laquelle :

R1 représente la concentration en agent biologique dans un échantillon de la gamme,

P représente le produit de la réaction $R1 + R2$ à un instant t,

P_{\max} représente la capacité maximale de la réaction,

κ représente la résistance des cellules cibles vivantes à répondre audit agent biologique,

r représente un coefficient qui dépend de R1 et qui correspond au coefficient de Hill, et

π représente la puissance intrinsèque de l'agent biologique à induire une réponse dans les cellules cibles vivantes, et

(e) le tri des valeurs de κ et de π obtenues en (d), pour chaque agent biologique et la sélection de l'agent biologique le plus adapté à l'application recherchée.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

5 3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'à l'étape (c), la détermination de P est réalisée soit de manière directe, par exemple par dosage de P, soit de manière indirecte, par exemple, à l'aide d'un test biologique convenablement sélectionné pour la mesure d'au moins un paramètre ou une variable reflétant la réponse du système biologique audit agent biologique.

10 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, la mesure d'au moins l'un des paramètres dérivés suivants :

- l'efficacité globale ϵ de la réaction induite par l'agent biologique sur ledit système,

15 - le titre apparent τ de l'agent biologique, correspondant à l'origine de la courbe théorique H obtenue en (d),

- le titre absolu θ dudit agent biologique défini par l'équation $\theta = \tau / s$ (3), dans laquelle s représente la sensibilité de la méthode de détection, et

- l'index d'hétérogénéité η de ladite réaction biologique.

20 5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la mesure du paramètre d'évaluation ϵ représentant l'efficacité spécifique d'un agent biologique apte à induire la production de P dans les cellules cibles vivantes est réalisée soit par mesure de la pente de la courbe théorique obtenue en (d) à son point d'inflexion, soit par calcul du maximum de la dérivée première et éventuellement de la dérivée seconde de la courbe théorique obtenue en (d).

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre la mesure des paramètres suivants : π/P_{\max} , κ/P_{\max} ou ϵ/P_{\max} .

30 7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les valeurs des paramètres de Hill correspondant à chaque agent biologique sont comparées à celles obtenues avec un agent biologique de référence.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que pour valider l'analyse de la réaction $R1+R2$ par l'équation de Hill, le procédé peut comprendre en outre une étape de traitement des données expérimentales obtenues à l'étape (d) (Hill plot), conformément à l'équation suivante :

5 $\log |P/(1 - P)|$ vs. $\log R1$.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend :

. la sélection des agents biologiques présentant des valeurs minimales acceptables pour les paramètres sélectionnés : π , κ , r , ϵ , θ , τ , η , π/P_{\max} , κ/P_{\max}
10 ou ϵ/P_{\max} et

. l'analyse itérative des courbes H correspondant auxdits agents biologiques sélectionnés, conformément à l'équation (2), pour éliminer les valeurs élevées par compensation, suivie de

. l'élimination des agents biologiques qui compensent et pour
15 lesquels des courbes alternatives peuvent être obtenues, pour la constitution d'une liste d'agents biologiques à action optimale.

1/3

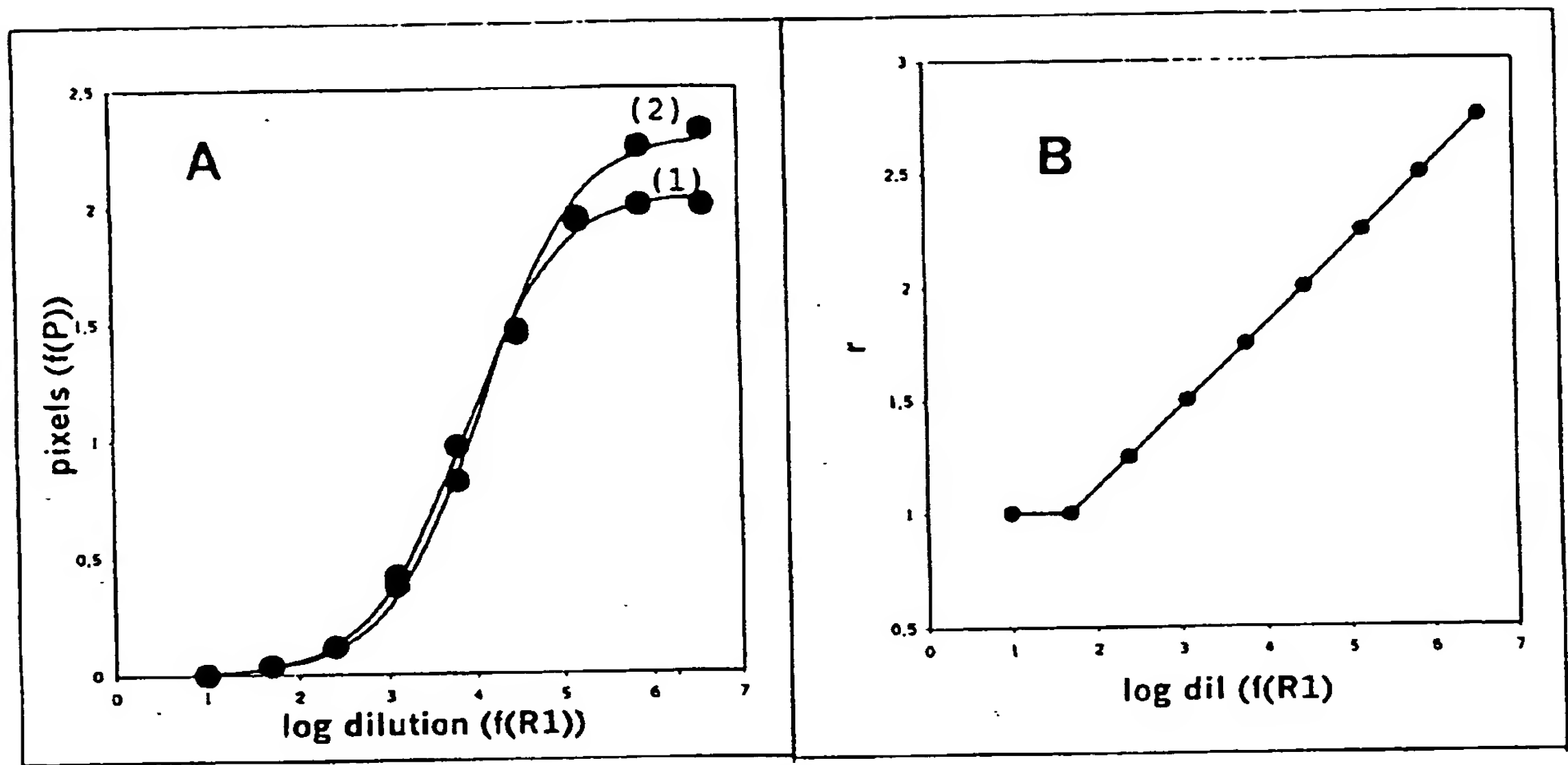


FIGURE 1

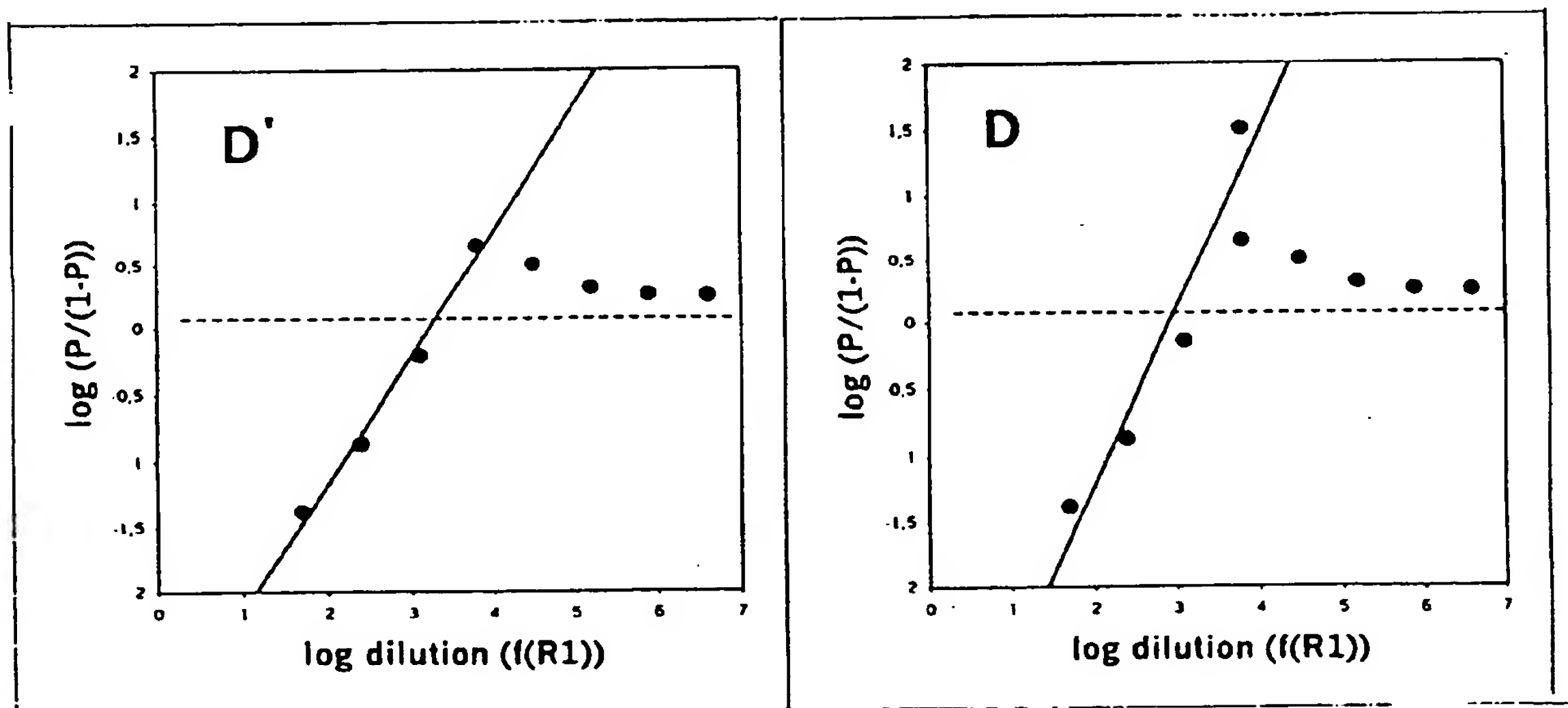


FIGURE 2

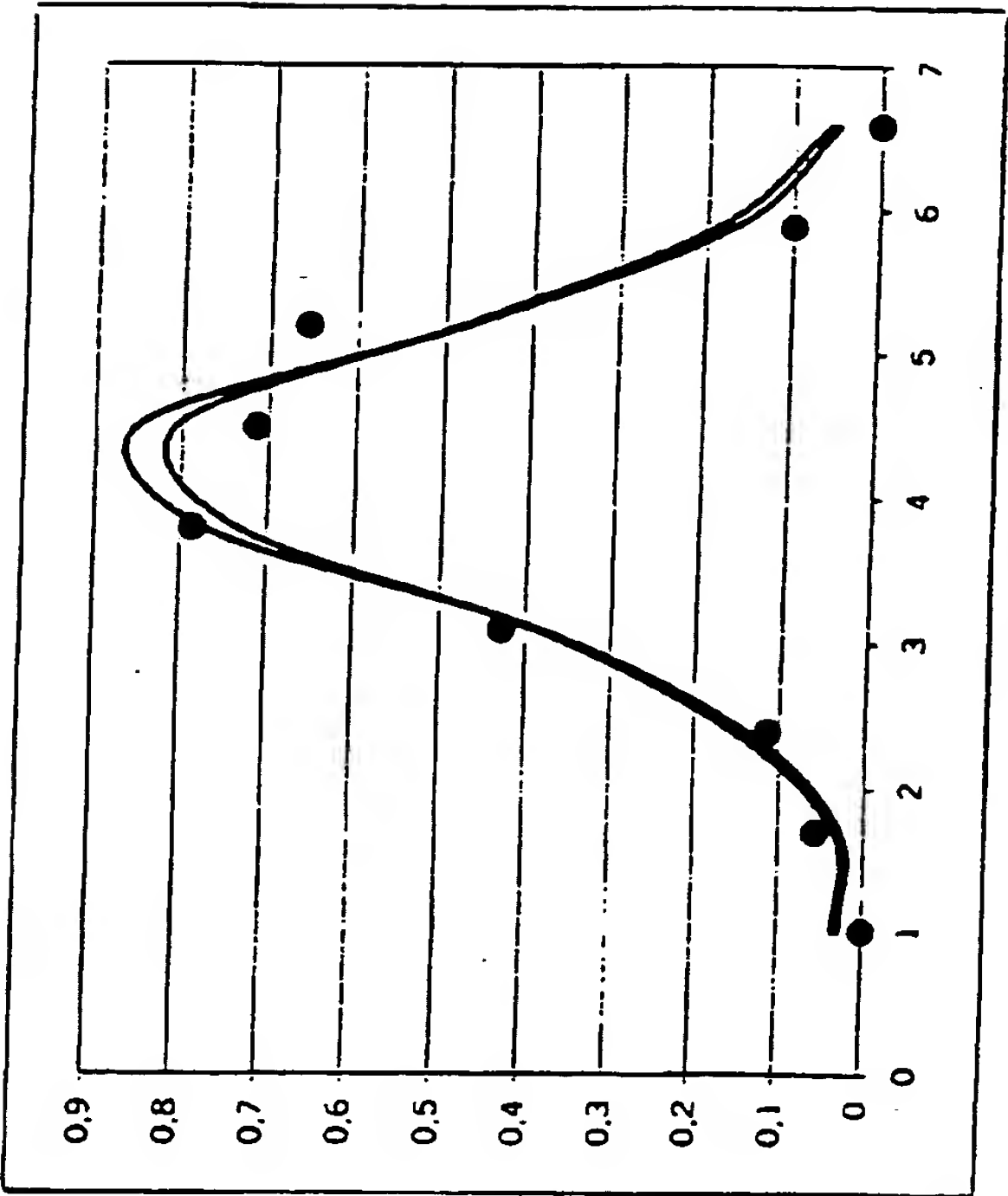


FIGURE 3

vol(f(R1))	log(dil)	P(1)	P(2)	H(1)	H(2)	n	H'(1)	H'(2)	Hill plot 1	Hill plot 2
0.1	1	0	0	0.0358	0.0281	1	0.0358	0.0281	0.0358	
0.02	1.6990	0.04	0.04	0.0601	0.0473	1	0.0347	0.0274	0.0347	1.3802
0.004	2.3979	0.12	0.12	0.1679	0.1442	1.25	0.1540	0.1385	0.1540	0.8653
0.0008	3.0969	0.42	0.38	0.4409	0.4130	1.5	0.3900	0.3840	0.3900	0.1402
0.00016	3.7959	0.97	0.82	0.9555	0.9552	1.75	0.7350	0.7746	0.7350	1.5097
0.000032	4.4949	1.47	1.45	1.5208	1.5522	2	0.8075	0.8528	0.8075	0.4952
0.0000064	5.1938	1.93	1.95	1.8591	1.8857	2.25	0.4834	0.4764	0.4834	0.3171
0.00000128	5.8928	2	2.25	1.9913	2.0038	2.5	0.1888	0.1688	0.3010	0.2553
0.000000256	6.5918	2	2.32	2.0332	2.0379	2.75	0.0599	0.0487	0.3010	0.2449

FIGURE 4

3/3

	Echantillon 1	Echantillon 2
P_{max}	2,05	2,35
τ (log dil)	5,89	5,89
π	0,125	0,172
π/P_{max}	0,06	0,07
κ	450	450
κ/P_{max}	219,5	191,5
ϵ	0,808	0,906
ϵ/P_{max}	0,394	0,385
η	1	1
Γ	1,0, 1,0, 1,25 1,5, 1,75, 2,0 2,25, 2,5, 2,75	1,0, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75
$\Delta r / \Delta$ (log dil)=cte.	0,313	0,313

FIGURE 5

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2802645

N° d'enregistrement
nationalFA 584789
FR 9915884

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 * page 363; figure 3 *	1-9	G01N33/53 C12Q1/68
A	SCHUHMANN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, novembre 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 * abrégé *	1-9	
A	MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 * page 199; figure 4 *	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int. CL. 7) G01N C12Q
D, A	ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 6B, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 * le document en entier *	1, 2	
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
2 octobre 2000		Hart-Davis, J	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.98 (P/MC14)



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2802645

N° d'enregistrement
national

FA 584789
FR 9915884

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 novembre 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 * le document en entier *	1,2	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
D,A	MITTEREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 * le document en entier *	1,2	
D,A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP002097712 ISSN: 1043-0342 * page 697, colonne 2, alinéa 2 - page 699, colonne 1, alinéa 1 *	1,2	
D,A	DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 * le document en entier *	1,2	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
2 octobre 2000		Hart-Davis, J	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)